

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

⑩ DE 101 20 835 A 1

⑥ Int. Cl.⁷:
C 12 P 21/08

DE 101 20 835 A 1

⑦ Aktenzeichen: 101 20 835.9
⑧ Anmeldetag: 27. 4. 2001
⑨ Offenlegungstag: 7. 11. 2002

<p>⑪ Anmelder: Sifin Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, 13088 Berlin, DE</p> <p>⑫ Vertreter: Albrecht, Lüke & Jungblut Patentanwälte, 14195 Berlin</p>	<p>⑬ Erfinder: Musielski, Herbert, Dr., 12589 Berlin, DE; Lehmann, Karla, 13059 Berlin, DE; Rüger, Kornelia, 13051 Berlin, DE</p> <p>⑭ Entgegenhaltungen: DE 692 13 695 T2 DE 689 25 971 T2 DE 689 13 962 T2 US 49 83 517 EP 02 24 800 B1</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑮ Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern
- ⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern in einem Batchverfahren, wobei Zellen, welche die Antikörper exprimieren, in einem Reaktor unter definierten Wachstumsbedingungen in einer Suspension, enthaltend Nährstoffmedium, kultiviert werden und wobei mittels Mitteln zum Stoffaustausch, welche eine Ausschlußgrenze unterhalb des Molekulargewichts der Antikörper aufweisen, Austauschmedium der Suspension zugeführt und Stoffwechselabfallprodukte der Zellen der Suspension entzogen werden mit den folgenden Verfahrensstufen: a) einer Anfahrphase, b) einer Aufbauphase und c) einer stationären Phase, welche sich aufgrund definiert eingestellter Zeldichten und Stoffaustauschraten zeitlich sehr lang ausdehnen läßt.

DE 101 20 835 A 1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern. In einem Batchverfahren, wobei Zellen, insbesondere Säugetierzellen, welche die Antikörper exprimieren, in einem Reaktor unter definierten Wachstumsbedingungen in einer Suspension enthaltend Nährstoffmedium kultiviert werden und wobei mittels Mitteln zum Stoffaustausch, welche eine Ausschlußgrenze unterhalb des Molekulargewichts der monoklonalen Antikörper aufweisen, Austauschmedium mit Nährstoffen der Suspension zugeführt und Stoffwechselabfallprodukte der Zellen der Suspension entzogen werden.

[0002] Zur Expression von monoklonalen Antikörpern hergerichtete Zellen sind typischerweise Hybridomzellen. Ein Batchverfahren ist ein Verfahren, in welchem eine Zellkultur eingerichtet wird, wobei die Zellen der Zellkultur für eine definierte Zeitspanne kultiviert werden und wobei produzierte monoklonale Antikörper nach der definierten Zeitspanne, typischerweise spätestens nach Eintritt in die Absterbephase (starker Abfall der Lebensfähigkeit bzw. Viability), aus der Zellkultur gewonnen werden. Die Zellen werden dabei verworfen. Eine Ausschlußgrenze gibt eine Obergrenze für die Größe von Molekülen, gemessen mittels des Molekulargewichtes, an, welche eine Membran oder Barriere zu passieren vermögen. Moleküle mit höherem Molekulargewicht sind nicht in der Lage die Membran oder Barriere zu permeieren. Nährstoffmedium enthält die wesentlichen Komponenten, die für das Zellwachstum bzw. die Proliferation wichtig sind. Nährstoffmedium in der hier verwendeten Terminologie kann auch Proteine, beispielsweise FCS (fetal calf serum), enthalten. Austauschmedium in der hier verwendeten Terminologie wird in der Regel keine Proteine mit einem Molekulargewicht über der Ausschlußgrenze enthalten, da diese nicht in die Suspension übertreten können. Eine Kultivierung in Suspension bezeichnet Zellkulturen, deren Zellen nicht oder nur schwach adhären. Bei einer Suspensionskultur sind typischerweise mehr als 90% der Zellen in Suspension, i. e. haften nicht an einer Oberfläche des Reaktors. Definierte Wachstumsbedingungen sind einrichtbar insbesondere durch Steuerung und/oder Regelung der Parameter Temperatur, pH und O₂-Gehalt. Diese Parameter werden auf vorgegebene Werte eingestellt nach Maßgabe von optimalen Kultivierungseffekten. Die Parameter werden meist konstant gehalten, es ist aber auch möglich, diese Parameter im Laufe eines Batches gezielt zu variieren. Mittel zum Stoffaustausch sind Membranen oder Barrieren, durch die ein Stoffaustausch im Wege diffusiver und/oder konvektiver Prozesse stattfinden kann. Eine solche Membran oder Barriere trennt ansonsten das Austauschmedium von der Suspension in definierte Volumenräume. Antikörper in der hier gewählten Terminologie umfassen neben Antikörpern im eigentlichen Sinne auch andere pharmazeutisch brauchbare Stoffe, die von Zellen produziert werden können.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Insbesondere monoklonale Antikörper gewinnen in zunehmendem Maße an Bedeutung als Wirkstoffe in pharmazeutischen Zusammensetzungen. Daher werden monoklonale Antikörper in großen Mengen benötigt, und zwar zu möglichst geringen Herstellungskosten. Beides wird in hohem Maße von der Effektivität der Kultivierung der produzierenden Zellen bestimmt.

[0004] Von besonderer Bedeutung in diesen Zusammen-

hängen ist, wie lange die Zellen eines Batches zur Produktion von Antikörpern in der Lage sind. Dies hängt insbesondere von der Dauer der Lebensfähigkeit der eingesetzten Zellen unter den Kulturbedingungen ab. Diese Kulturbedingungen unterliegen jedoch hinsichtlich der Zusammensetzung der Suspension schwer kontrollierbaren Kriterien, insbesondere biochemischen Prozessen, die die Lebensfähigkeit der Zellen negativ beeinflussen und/oder Apoptose der Zellen induzieren. Hierbei können beispielsweise Nährstoffmangel und/oder Stoffwechselabfallprodukte, aber auch Signale, die von Zellen nach Maßgabe der Wachstumsphase, des Zell/Zell-Kontaktes, der Zeldichte usw. erzeugt werden, eine Rolle spielen.

Stand der Technik

[0005] Aus der Literaturstelle EP 0 224 800 B1 ist ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen bekannt, welches der Gewinnung beispielsweise von monoklonalen Antikörpern dient. Hierbei handelt es sich um ein Batch Verfahren, wobei Zellen in Suspension kultiviert werden. Im Rahmen der insofern bekannten Maßnahmen sind in dem Reaktor semipermeable Membranhohlfasern eingerichtet, durch welche ein durch die Hohlfaserwandungen von der Suspension getrenntes Austauschmedium in einem Kreislauf geführt wird. Durch die Hohlfaserwandungen treten Nährstoffe aus dem Austauschmedium in die Suspension und Stoffwechselabfallprodukte aus der Suspension in das Austauschmedium ein.

[0006] Aus der Literaturstelle JP-A-60/207581 ist ein nahezu identisches Verfahren bekannt, welches sich lediglich dadurch unterscheidet, daß das Austauschmedium nicht im Kreislauf geführt wird. Vielmehr wird das Austauschmedium in Membranhohlfasern, welche keine Ausströmöffnung aufweisen, hineingeleitet und Druckbeaufschlagt. Hierdurch treten Nährstoffe in die Suspension über. Nach einer vorgegebenen Zeitspanne werden die Druckverhältnisse umgekehrt, wodurch u. a., Stoffwechselabfallprodukte aus der Suspension entnommen werden. Dieser Vorgang wiederholt sich.

[0007] Mit beiden vorstehenden Methoden werden vergleichbare Zeldichten und vergleichbare Ausbeuten an Antikörpern erhalten. Beiden Methoden ist weiterhin gemeinsam, daß ein Batch typischerweise unmittelbar nach Ende der logarithmischen Proliferationsphase oder spätestens einige wenige Tage hiernach abgebrochen wird, da die Zunahme der Antikörper-Konzentration abnimmt oder die Konzentrationsänderung gar auf 0 fällt aufgrund des Eintritts in die Absterbephase.

[0008] Aus der Literaturstelle Gori, G. B., Applied Microbiology, 13: 93–98 (1965), ist ein Bioreaktor bekannt, welcher mit einem Dialyseschläuch, der von einem PGS enthaltenden Nährmedium durchströmt wird, ausgestattet ist. Bei dem mit diesem Reaktor durchgeföhrten Verfahren wird chemostatisch gearbeitet und es werden nur recht niedrige Zeldichten erreicht.

Technisches Problem der Erfindung

[0009] Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Batchverfahren zur Herstellung von Antikörpern mittels einer Zellsuspension anzugeben, welches pro Batch eine erhöhte Menge an Antikörpern liefert.

Grundzüge der Erfindung

[0010] Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern in

einem Batchverfahren, wobei Zellen, welche die Antikörper exprimieren, in einem Reaktor unter definierten Wachstumsbedingungen in einer Suspension enthaltend Nährstoffmedium kultiviert werden und wobei mittels Mitteln zum Stoffaustausch, welche eine Ausschlußgrenze unterhalb des Molekulargewichts der Antikörper aufweisen, Austauschmedium der Suspension zugeführt und Stoffwechselabfallprodukte der Zellen der Suspension entzogen werden mit den folgenden Verfahrensstufen: a) in einer Aufbauphase wird der Reaktor angeimpft und durch stufenweise Zufuhr von Nährstoffmedium über Mittel zur Mediumzufuhr exponentielles Wachstum der Zellen initiiert, wobei die Zeldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension, in einem Bereich von 1×10^5 bis 5×10^6 Zellen/ml gehalten wird, b) in einer Aufbauphase werden die Mittel zum Austausch betrieben, wobei Austauschmedium mit definiertem Volumen durch die Mittel zum Austausch in einem Kreislauf gepumpt wird, mit der Maßgabe, daß die Zeldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension zuzüglich dem Mediumvolumen im Kreislauf, einen Wert von 1×10^5 /ml nicht unterschreitet, und wobei im Verlauf der Aufbauphase eine Zeldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension, von zumindest 5×10^6 /ml erreicht wird, c) nach Erreichen einer Zeldichte von zumindest 5×10^6 /ml in Stufe b) wird eine stationäre Phase eingeleitet, wobei durch Einrichtung und taktweiser Umkehr eines Druckgradienten zwischen Kreislauf und Reaktor eine Stofftransport durch die Mittel zum Stoffaustausch entlang des Druckgradienten eingestellt wird, wodurch Nährstoffe aus dem Austauschmedium in den Reaktor ein- und Stoffwechselabfallprodukte aus dem Reaktor in das Austauschmedium ausgetragen werden, wobei der Volumenaustausch 0,05 bis 1 des Suspensionsvolumens/Tag entspricht.

[0011] Das Volumen der Suspension setzt sich aus dem Volumen des Nährstoffmediums und der Zellen zusammen. Das Animpfen eines Reaktors erfolgt dadurch, daß in den Reaktor Nährstoffmedium und Zellen eingebracht werden. Dabei werden typischerweise Zeldichten von 1×10^5 bis 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Der Ausdruck der Zeldichte bezieht sich stets auf die Dichte lebender Zellen. Die stationäre Phase ist dadurch gekennzeichnet, daß die Zeldichte praktisch unverändert ist und die Zellen mit praktisch konstanten Freisetzungsraten Antikörper produzieren. Mittel zur Mediumzufuhr arbeiten ohne Ausschlußgrenze und sind typischerweise Einlaßöffnungen oder Einlaßschleusen in einer Reaktorwandung. Mittel zum Stoffaustausch sind typischerweise zumindest zum Teil permanent (bezogen auf die Dauer des Stoffaustausches) in die Suspension eingetaucht und mit einer Wandung somit in Kontakt mit der Suspension. Die gegenüberliegende Wandung steht in Kontakt mit dem Austauschmedium.

[0012] Im Kern wird in der Stufe a) die absolute Anzahl der Zellen expandiert, und zwar einhergehend mit einer Volumenzunahme der Suspension, so daß die Zeldichten trotz der Proliferation im wesentlichen konstant bleiben. In der Stufe b) findet dagegen sowohl eine Erhöhung des Volumens der Suspension als auch der Zeldichten statt. Es lassen sich zum Ende der Stufe b) bis zu 3×10^7 Zellen/ml und mehr erreichen.

[0013] Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die Lebensfähigkeit der Zellen sich beachtlich fördern bzw. über einen langen Zeitraum konservieren läßt, wenn die Zeldichten einerseits und die Zufuhr von Austauschmedium andererseits in den angegebenen Grenzen gehalten werden. Hierbei ist insbesondere überraschend, daß eine beliebige Erhöhung der Zufuhr von Nährstoffen nicht etwa die Lebensfähigkeit der Zellen fördert, vielmehr daß bei Überschreiten einer Obergrenze der Zufuhr die Lebensfähigkeit sogar irreversibel und drastisch abnimmt, i. e. Apoptose in-

duziert wird.

[0014] Mit der Erfindung wird erreicht, daß eine eine ausgedehnte stationäre Phase an die Aufbauphase angeschlossen werden kann, die bis zu 30 Tage und mehr währen kann. Somit wird mit einem einzigen Batch ein Vielfaches der Menge an Antikörpern produziert, verglichen mit dem Stand der Technik, wo eine allenfalls nur ansatzweise stationäre Phase gefahren werden kann. Somit wird für eine vorgegebene Menge an Antikörper beachtlich weniger Aufwand bei der Bereitstellung von Zellen und dem Betrieb der technischen Einrichtungen benötigt. Von besonderer Bedeutung für die pharmazeutische Zwecke der Antikörper ist aber auch, daß mit dem Stand der Technik auch nicht annäherungsweise erreichbare Konzentrationen der Antikörper erreicht werden.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

[0015] Bevorzugt ist es zur effektiven Rückhaltung der Antikörper und universeller Einsatzbarkeit der Mittel zum Stoffaustausch bei unterschiedlichen zu produzierenden Antikörpern, wenn die Ausschlußgrenze im Bereich von 2000 bis 20000 Dalton, vorzugsweise im Bereich von 3000 bis 10000 Dalton liegt.

[0016] Die Zeldichte in der Stufe a) wird bevorzugterweise in einem Bereich von 5×10^5 bis 3×10^6 Zellen/ml gehalten. Die Untergrenze der Zeldichte in der Stufe b) unterschreitet zweckmäßigerweise einen Wert von 3×10^5 /ml bis 3×10^6 /ml nicht. Die Aufbauphase wird vorteilhafterweise bis zu einer Zeldichte von zumindest 1×10^6 /ml, besser bis zu zumindest 1×10^7 /ml gefahren.

[0017] Einen optimalen Stoffaustausch sowohl der Nährstoffe als auch der Stoffwechselabfallprodukte erhält man, wenn die Takte in Stufe c) periodisch mit einer Periodenlänge von 10 bis 3000 s eingerichtet sind. Die Takte können durch den Füllstand im Reaktor gesteuert werden, wobei bei Erreichen eines definierten maximalen Füllstandes der Druckgradient zum Kreislauf hin abfällt und bei Abfall auf einen definierten minimalen Füllstand zum Reaktor hin abfällt. In dieser Ausführungsform ist ein Füllstandmesser eingerichtet und mit einer Steuerung der Druckverhältnisse verbunden, welcher zwei Schaltgrenzen aufweist, den minimalen und den maximalen Füllstand. Diese beiden Grenzen bilden dann die Regelungstechnische Hystereseschleife. Die Steuerung kann dann beispielsweise den Druck des Austauschmediums in den Mitteln zum Austausch so steuern, daß er bei Erreichen des maximalen Füllstandes auf eine vorgegebene Druckdifferenz unterhalb des Druckes im Reaktor und bei Erreichen des minimalen Füllstandes auf eine vorgegebene Druckdifferenz oberhalb des Druckes im Reaktor gesteuert wird. Es kann auch mit dem Füllstand in Beziehung stehenden Maßgrößen gearbeitet werden, beispielsweise einem maximalen Druck im Reaktor und einem minimalen Druck im Reaktor. Denn der Reaktor ist typischerweise ein geschlossenes System, in welchem die Druckverhältnisse definiert steuerbar sind.

[0018] Es kann optional auch in der Stufe b) Nährstoffmedium über die Mittel zur Mediumzufuhr zugeführt werden. Dann findet ein Nährstoffeintrag sowohl über die Mediumzufuhr als auch über die Mittel zum Stoffaustausch statt. Die Stufe b), in welcher Variante auch immer, wird bis zum Erreichen eines definierten maximalen Füllstandes im Reaktor durchgeführt. Hierbei kann Austauschmedium in einer Menge von 1 bis 50 ml/ 10^8 Zellen und Tag, vorzugsweise von 5 bis 30 ml/ 10^8 Zellen und Tag, dadurch mit dem Reaktorkorrespondieren, daß vorzugsweise zwischen dem Kreislauf und dem Reaktor ein zum Reaktor hin abfallender Druckgradient eingestellt wird.

[0019] In der Stufe c ist vorteilhafterweise eine Geschwindigkeit des (konvektiven) Stoffaustausches eingestellt, die pro 24 h das 0,01- bis 1-fache, vorzugsweise das 0,05- bis 0,5-fache des Suspensionsvolumens beträgt.

[0020] Insbesondere im Hinblick auf sich im Austauschmedium akkumulierende Stoffwechselabfallprodukte und damit einem abnehmenden Konzentrationsgradienten durch die Mittel zum Stoffaustausch kann es sich empfehlen, das Austauschmedium des Kreislaufes nach einer definierten Zeitspanne gegen frisches Austauschmedium auszutauschen.

[0021] Die Mittel zum Stoffaustausch können grundsätzlich beliebig in Hinblick auf Materialien und Größe der Oberflächen ausgebildet sein, sofern sich die o. g. Austauschraten einstellen lassen und die Ausschlußgrenze eingerichtet ist. Es ist dem Fachmann ohne weiteres möglich, die Werkstoffauswahl sowie die geometrische Ausbildung nach diesen Maßgaben auszubilden. Es kommen beispielsweise eine handelsübliche Dialysemembran, vorzugsweise in Schlauchform, oder ebenfalls handelsübliche Mikrohohlfasern, wie beispielsweise in der Literaturstelle EP 0 224 800 B1 beschrieben, in Frage. In beiden Fällen wird die Austauschr率te außer von den geometrischen Eigenschaften (Oberfläche, Struktur des Materials, wie Oberflächenstruktur und/oder Porenstruktur) auch von der Strömungsgeschwindigkeit des Austauschmediums durch den Schlauch bzw. die Mikrohohlfaser abhängen sowie von dem Druckgradienten durch die Membran, der neben diffusiven Prozessen auch konvektive Prozesse durch die Membran induziert.

[0022] Die Stufe c) wird zweckmäßigerweise nach Absinken der Antikörper-Freisetzungsrate (Abnahme des Anstiegs der Antikörperkonzentration als Funktion der Zeit) abgebrochen und die Antikörper werden aus der Suspension gewonnen. Die Details einer Gewinnung der Antikörper aus der Suspension sind dem Fachmann gut vertraut und brauchen daher nicht näher erläutert zu werden. Als Abbruchkriterium kann beispielsweise ein Vergleich der Steigung einer Kurve Konzentration Antikörper in der Suspension (Ordinate) gegen Zeit (Abszisse) in 24 h Abstand verwendet werden. Nimmt die Steigung um einen definierten relativen Betrag ab, beispielsweise 20%, so wird planmäßig abgebrochen. Alternativ kann ein absoluter Grenzwert der Steigung bei Unterschreitung als Abbruchkriterium dienen.

[0023] Neben der Einstellung definierter Kultivierungsbedingungen, wie oben beschrieben, wird es sich empfehlen, die Suspension vorzugsweise kontinuierlich umzuwälzen, damit die Suspension die Oberfläche der Mittel zum Stoffaustausch umfließt und so der Stoffaustausch gefördert und besser kontrolliert werden kann. Auch ist eine praktisch homogene Zusammensetzung der Suspension wünschenswert. Bingesetzte Mittel zum Umlöpfen sollten möglich zellschonend arbeiten. Bewährt hat sich beispielsweise ein Segelblattrührer.

[0024] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen Beispielen näher erläutert. Es zeigen:

[0025] Fig. 1 ein Diagramm mit Zeitfunktionen der Zeldichte sowie der Konzentration monoklonaler Antikörper für ein erfundungsgemäßes Verfahren, und

[0026] Fig. 2 ein Diagramm eines Vergleichsversuches mit dem gegenüber erhöhtem Austausch.

Beispiel 1

Messung von Zeldichten

[0027] Die Zeldichte lebender Zellen in der Suspension

lässt sich anhand einer entnommenen Probe bestimmen. In einer Neubauer Zählkammer werden von der mit 1% Trypanblau versetzten und ggf. vorverdünnten Suspension (Endkonzentration: 0,2%) 4 große Quadrate ausgezählt. Als lebend werden die ungefärbten Zellen und als tot die gefärbten Zellen bewertet. Anhand des eingesetzten Suspensionsvolumens, ggf. des Verdünnungsfaktors sowie dem Volumen Trypanblau lässt sich die Zahl der lebenden Zellen je ml berechnen.

Beispiel 2

Messung von Antikörperkonzentrationen

[0028] Die Antikörperkonzentration lässt sich mit verschiedenen Standardmethoden messen. Dies sind beispielsweise Enzyme Immuno Assay, Immunturbidimetrische Bestimmung monoklonaler IgG Antikörper, Photometrische Bestimmung des reziproken Titers und Bestimmung des serologischen Titers, visuell bewertet als Agglutination von bakteriellen Prüfstämmen, jeweils nach Vorschrift der Kit-Hersteller.

Beispiel 3

Messung des Volumenaustausches

[0029] Der Volumenaustausch lässt sich mittels einer Prüfverfahrensstufe mit einem Leereaktor bestimmen. Hierfür wird der Reaktor wie im Normalbetrieb betrieben, nur ohne Zellen und nicht bis zum maximalen Füllstand mit Nährmedium gefüllt. Es versteht sich, daß die Mittel zum Stoffaustausch praktisch vollständig in dem Nährmedium eintauchen. Es wird eine Reihe von definierten Druckdifferenzen zwischen Nährmedium im Reaktor und Austauschmedium im Kreislauf eingestellt (Gradient zum Nährmedium hin abfallend) und dann in Abhängigkeit von der Zeit die Volumenzunahme im Reaktor gemessen. Man erhält eine Kurvenschar, die spezifisch für die eingesetzten Mittel zum Stoffaustausch ist, und aus welcher sich ein definierter Stoffaustausch durch Einstellung der Druckdifferenz einstellen lässt. Wenn Mittel zum Stoffaustausch eingesetzt werden, die aufgrund kapillärähnlichem Aufbau einen nennenswerten Druckabfall aufweisen, wird der Druck im Kreislauf eingangssseitig gemessen.

[0030] Im Falle von Mittel zum Stoffaustausch, deren Porenstruktur in Transportrichtung veränderlich ist (sogenannte asymmetrischen Membranen, wie beispielsweise Hohlfasern mit schaumartiger Membranstruktur aus Polysulfon), kann es sich empfehlen, die vorstehenden Messungen zu Kontrollzwecken mit reversem Druckgradienten durchzuführen. Ggf. kann dann im Betrieb mit entsprechenden asymmetrischen Druckgradienten gearbeitet werden, wenn die Volumenströme bei verschiedenen Taktten bzw. Stromrichtungen gleich sein sollen. In der Regel werden jedoch praktisch keine Unterschiede festzustellen sein.

Beispiel 4

Aufbau eines Reaktors

[0031] Ein in einem erfundungsgemäßen Verfahren beispielsweise einsetzbarer Reaktor weist die folgenden Bauelemente auf. Es ist ein Reaktorgefäß eingerichtet, welches ein Volumen beispielsweise im Bereich von 1 bis 5 l aufweisen kann. Das Reaktorgefäß weist Sensoren für die Messung von Füllstand, Temperatur, pH und O₂ auf. Es sind Anschlüsse zur Zufuhr von Nährstoffmedium sowie ggf. zur

Begasung, Probenentnahme und Suspensionsentnahme (Entleerung) eingerichtet. Im Inneren des Reaktors ist ein Stoffaustauschmodul eingerichtet, welches an einen Kreislauf weiterhin aufweisend eine Kreislaufpumpe, beispielsweise peristaltische Schlauchpumpe, anschließbar ist. Dabei kann der Kreislauf so eingerichtet sein, daß die Mittel zum Stoffaustausch im Durchfluß betrieben werden. In diesem Falle sind in den Mitteln zum Stoffaustausch zumindest jeweils eine Eingangs- und eine Ausgangsöffnung vorgesehen. Es ist aber auch möglich, einen Kreislauf einzurichten, an welchem die Mittel zum Stoffaustausch lediglich einseitig angeschlossen sind. Dann wird Austauschmedium einseitig in die Mittel zum Stoffaustausch hinein gedrückt bzw. herausgedrückt, jeweils nach Maßgabe des Vorzeichens des angelegten Druckgradienten. In jedem Fall strömt Austauschmedium durch die Mittel zum Stoffaustausch, da das Austauschmedium die Membran durchströmt bzw. hindurch diffundiert.

[0032] Der Füllstandssensor ist mit einer elektronischen Steuerungsvorrichtung verbunden, mittels welche die Druckdifferenz zwischen Reaktor und Kreislauf ansteuerbar ist.

[0033] Die weiteren Sensoren sind mit üblichen Steuerungs- und Regelungsvorrichtungen verbunden, die entweder die gemessenen Parameter konstant halten oder definierte Programme (zeitliche Verläufe) der Parameter steuern und regeln.

[0034] Die Suspension wird beispielsweise mittels eines Segelblattrührers umgewälzt.

[0035] Als Mittel zum Stoffaustausch ist ein Dialyse-schlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 eingerichtet, wobei die geometrischen Dimensionen so gewählt sind, daß sich in einer Prüfverfahrensstufe gemäß Beispiel 3 die gewünschten Austauschraten erzielen lassen. Dies ist ohne weiteres durch einfache Versuche ermittelbar. Alternativ ist es möglich Mikrohohlfasern, beispielsweise aus Polysulfon einzusetzen. Für deren Geometric gilt das Vorstehende analog. Da sterilisierbare Mikrohohlfasern mit Ausschlußgrenzen unterhalb 10000 ohne weiteres käuflich erwerbar sind, die Sterilisierung von Dialyseschläuchen mit sehr niedrigen Ausschlußgrenzen demgegenüber nicht inuner unkompliziert ist, kann sich der Einsatz von Mikrohohlfasern lohnen, wenn niedrige Ausschlußgrenzen bei einfacher Sterilisierbarkeit gefragt sind.

[0036] Weiterhin ist eine übliche Begasungseinheit zur Einleitung von Luft, O₂ und/oder CO₂ in die Suspension eingerichtet.

Beispiel 5

Herstellung von monoklonalen Antikörpern

[0037] Vor dem Einsatz des Bioreaktors werden alle Komponenten nach Vorschrift sterilisiert und die Sensoren ggf. kalibriert. Das Mittel zum Stoffaustausch wird auf Dichtheit geprüft (Blasenbildung bei innenseitiger Beaufschlagung mit Gas und Eintauchen in eine Flüssigkeit). Dann werden alle vorstehend beschriebenen Komponenten montiert und der komplette Aufbau durch Autoklavierung nachsterillisiert. Der insofern sterile Reaktor wird dann positioniert und die elektrischen Anschlüsse sowie die Fluidanschlüsse und Gasanschlüsse werden steril hergestellt.

[0038] Das Animpfen erfolgt dadurch, daß Nährstoffmedium (handelsübliches DMEM, supplementiert mit Natriumbikarbonat, L-Glutamin, Gentamycin, Pyruvat, Glucose und PCS) und Zellen in den Reaktor eingebracht werden, wobei die Zeildichte auf etwa 1×10^6 /ml, bezogen auf das Volumen der Suspension, eingestellt wird.

[0039] Anschließend wird stufenweise Nährstoffmedium zugeführt, wobei die Menge zugegebenen Nährstoffmediums nach Maßgabe von Messungen der Zeildichte so gewählt wird, daß die Zeildichte annähernd konstant bleibt.

5 Die Zugabe erfolgt bis zu einem vorgegebenen Füllstand.

[0040] Nach Erreichen des vorgegebenen Füllstandes der Anfahrphase, ggf. bereits zuvor, werden die Mittel zum Stoffaustausch in Betrieb genommen. In dieser Aufbauphase wird die Zeildichte auf zumindest 5×10^6 /ml (bezogen auf das Volumen der Suspension) erreicht. Eine Volumenzunahme der Suspension erfolgt durch Zufluß von Austauschmedium. Dieser Zufluß wird (über einen Druckgradienten) so gesteuert und überwacht, daß die Zeildichte einen vorgegebenen Mindestwert nicht unterschreitet. Im Rahmen der Aufbauphase wird Austauschmedium in einer Menge von ca. 37 ml/ 10^8 Zellen und Tag in den Reaktor eingetragen.

[0041] Nach Erreichen der Mindestzeildichte der Aufbauphase wird die stationäre Phase eingeleitet. Hierbei wird taktweise ein vorgegebener Druckgradient zwischen Suspension und Kreislauf umgekehrt, wobei die Umkehrpunkte durch eingestellte minimale und maximale Füllstände, gemessen mittels des Füllstandssensors, angesteuert werden. Die Taktdauer kann, je nach gewünschter Austauschrate, zwischen 10 und 3000 s betragen. Sie hängt auch von veränderlichen Eigenschaften der Mittel zum Stoffaustausch (z. B. blocking) ab, wenn mit konstantem Druckgradient gearbeitet wird.

[0042] Im Zuge des vorstehenden Verfahrens wird in definierten Zeitabständen die Zeildichte gemessen, ebenso wie die Antikörperkonzentration. In der Fig. 1 sind die Ergebnisse für die käuflich frei verfügbare Zelllinie AntiA-A003 dargestellt. Man erkennt zunächst, daß sich hohe Zeildichten, wie beim eingangs genannten Stand der Technik erreichen lassen. Erfindungswesentlich ist aber, daß die Antikörperproduktion bis 30 Tage ab Anfahrphase und mehr anhält, ohne daß ein Abflachen des Anstiegs der Konzentrationskurve erkennbar ist. Im Ergebnis wird pro Volumeneinheit Suspension eine um ein Vielfaches höhere Antikörperkonzentration dadurch erreicht, daß nicht im Bereich von Tag 10 bis 12 abgebrochen werden muß, wie im Stand der Technik, sondern eine ausgedehnte stationäre Phase (konstante maximale Zeildichte) gefahren werden kann.

[0043] Es werden regelmäßig Antikörperkonzentrationen von 1 bis 4 mg/ml Suspension und mehr erreicht. Gemäß beispielsweise EP 0 224 800 B1 sind nicht mehr als 300 µg/ml erzielbar. Gleichzeitig wird zur Herstellung derselben absoluten Antikörpermengen lediglich 40–60% der Menge an Medium, verglichen mit einem klassischen 50 Batchverfahren, benötigt. Die Integrität der erfundungsgemäß hergestellten Antikörper (Quotient aus aktiver und passiver mAK-Bestimmung) genügt dabei allen Anforderungen.

Beispiel 6

Vergleichsbeispiel mit erhöhtem Eintrag von Austauschmedium in der Stufe b)

[0044] In diesem Vergleichsversuch wurde grundsätzlich analog dem Beispiel 5 verfahren, wobei jedoch in der Verfahrensstufe b) 100 ml/ 10^8 Zellen und Tag an Aufbaumedium eingetragen wurden durch geeignete Erhöhung des Druckgradienten. Die so gewonnenen Daten sind in der Fig. 2 dargestellt.

[0045] In der Fig. 2 erkennt man, daß die Stufe b) sich bis ca. Tag 5 erstreckt. In der Stufe b) erkennt man zwar einen starken Anstieg der Zahl lebender Zellen/ml, diese fällt je-

doch kurz nach Einleitung der Stufe c) wieder ab. Gleichzeitig steigt die Zahl der toten Zellen stark an, mit entsprechender Abnahme der Viability, und man erkennt, daß bei ca. Tag 9, i. e. bereits am Tag 4 der Stufe c) kaum noch lebende Zellen präsent sind. Entsprechend findet auch keine Zunahme der Antikörperkonzentration mehr statt mit entsprechend niedriger Endkonzentration. Offenbar existiert auch eine Obergrenze bei der Nährstoffzufuhr, bei deren deutlicher Überschreitung Apoptose unter physiologischen Bedingungen, i. e. nicht toxisch bedingt, induziert, und zwar irreversibel. Die Irreversibilität ist beispielsweise daran erkennbar, daß eine Reduktion des Austausches in Stufe c) nicht zu einem Erholungseffekt führt. In Beispiel ist somit die Ursächlichkeit in dem Überaustausch in Stufe b) demonstriert. Es ist davon auszugehen, daß ein Überaustausch in Stufe c) 15 analoge Effekte bewirkt, nur entsprechend zeitlich verzögert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern in einem Batchverfahren, wobei Zellen, welche die Antikörper exprimieren, in einem Reaktor unter definierten Wachstumsbedingungen in einer Suspension enthaltend Nährstoffmedium kultiviert werden und wobei mittels Mitteln zum Stoffaustausch, welche eine Ausschlußgrenze unterhalb des Molekulargewichts der Antikörper aufweisen, Austauschmedium der Suspension zugeführt und Stoffwechselabfallprodukte der Zellen der Suspension entzogen werden mit den folgenden Verfahrensstufen:

a) in einer Anfahrphase wird der Reaktor angeimpft und durch stufenweise Zufuhr von Nährstoffmedium über Mittel zur Mediumzufuhr exponentielles Wachstum der Zellen initiiert, wobei die Zelldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension, in einem Bereich von 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen/ml gehalten wird,

b) in einer Aufbauphase werden die Mittel zum Austausch betrieben, wobei Austauschmedium mit definiertem Volumen durch die Mittel zum Austausch in einem Kreislauf gepumpt wird, mit der Maßgabe, daß die Zelldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension zuzüglich dem Mediumvolumen im Kreislauf, einen Wert von 1×10^5 /ml nicht unterschreitet, und wobei im Verlauf der Aufbauphase eine Zelldichte, bezogen auf das Volumen der Suspension, von zumindest 5×10^6 /ml erreicht wird,

c) nach Erreichen einer Zelldichte von zumindest 5×10^6 /ml in Stufe b) wird eine stationäre Phase eingeleitet, wobei durch Einrichtung und taktweiser Umkehr eines Druckgradienten zwischen Kreislauf und Reaktor eine Stofftransport durch die Mittel zum Stoffaustausch entlang des Druckgradienten eingestellt wird, wodurch Nährstoffe aus dem Austauschmedium in den Reaktor ein- und Stoffwechselabfallprodukte aus dem Reaktor in das Austauschmedium ausgetragen werden, wobei der Volumenaustausch 0,05 bis 1 des Suspensionsvolumens/Tag entspricht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Ausschlußgrenze im Bereich von 2000 bis 20000 Dalton, vorzugsweise im Bereich von 3000 bis 10000 Dalton liegt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Zelldichte in der Stufe a) in einem Bereich von 5×10^5 bis 3×10^6 Zellen/ml gehalten wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei

die Untergrenze der Zelldichte in der Stufe b) einen Wert von 3×10^5 /ml bis 3×10^6 /ml nicht unterschreitet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Aufbauphase bis zu einer Zelldichte von zumindest 1×10^6 /ml gefahren wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Takte in Stufe c) periodisch mit einer Periodenlänge von 10 bis 3000 s eingerichtet sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei in der Stufe b) Nährstoffmedium über die Mittel zur Mediumzufuhr zugeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Stufe b) bis zum Erreichen eines definierten maximalen Füllstandes im Reaktor durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Takte durch den Füllstand im Reaktor gesteuert werden, wobei bei Erreichen eines definierten maximalen Füllstandes der Druckgradient zum Kreislauf hin abfällt und bei Abfall auf einen definierten minimalen Füllstand zum Reaktor hin abfällt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei in der Stufe b) Austauschmedium in einer Menge von 1 bis $100 \text{ ml}/10^8$ Zellen und Tag, vorzugsweise von 5 bis $50 \text{ ml}/10^8$ Zellen und Tag, dadurch in den Reaktor eingetragen wird, daß zwischen dem Kreislauf und dem Reaktor ein zum Reaktor hin abfallender Druckgradient eingestellt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei in der Stufe c) eine Geschwindigkeit des Stoffaustausches eingestellt ist, die pro 24 h das 0,01- bis 1-fache des Suspensionsvolumens beträgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Austauschmedium des Kreislaufes nach einer definierten Zeitspanne ausgetauscht wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Mittel zum Stoffaustausch eine Dialysemembran, vorzugsweise in Schlauchform, und/oder Mikrohohlfasern umfassen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Stufe c) nach Absinken der AK-Preisetzungsraten abgebrochen und die Antikörper aus der Suspension gewonnen werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

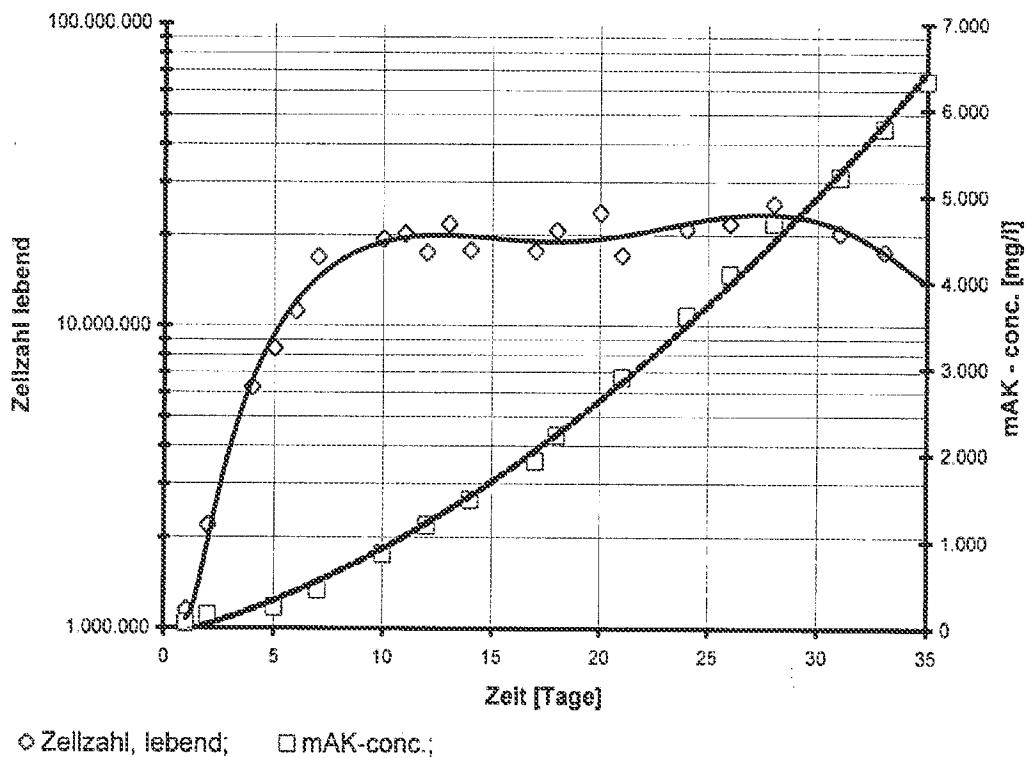
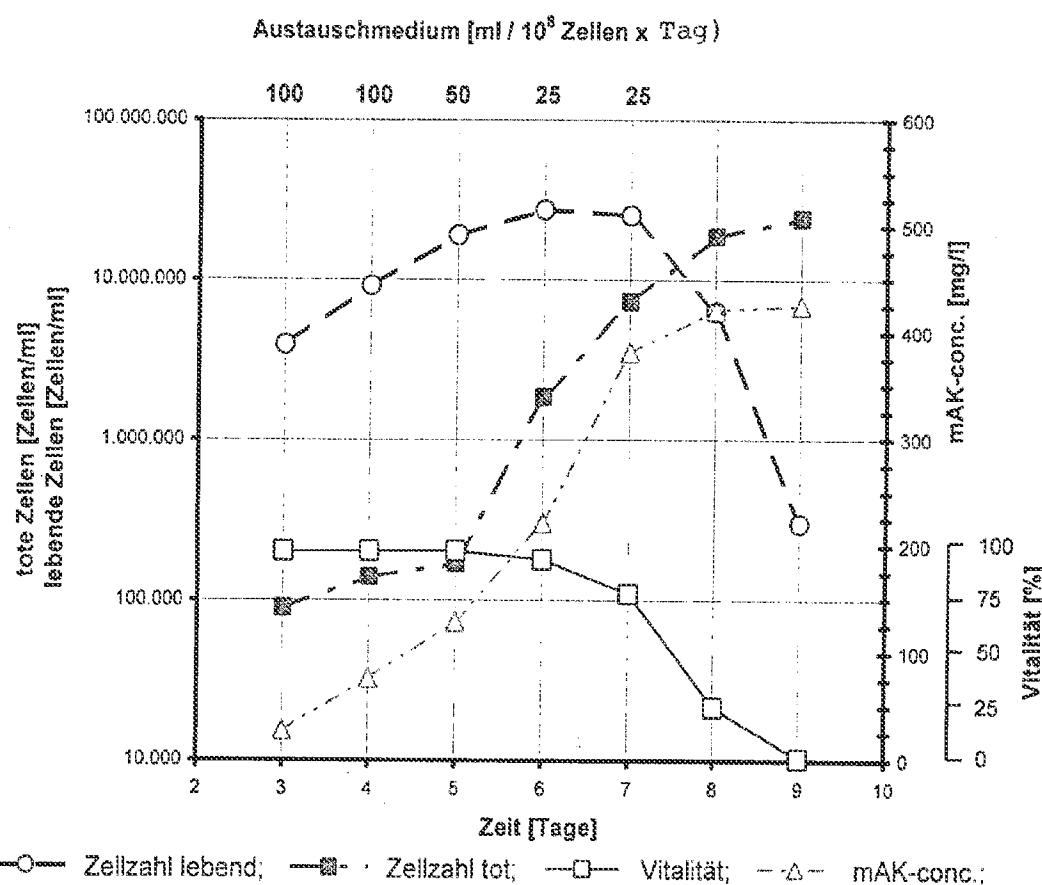
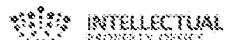


Abb. 2



**Espacenet****Bibliographic data: DE 10120835 (A1)**

Batch method for preparing antibodies, useful as pharmaceuticals, by culturing cells with exchange of medium and removal of metabolic waste products

Publication date: 2002-11-07**Inventor(s):** MUSIELSKI HERBERT [DE]; LEHMANN KARLA [DE]; RUEGER KORNELIA [DE] +**Applicant(s):** SIFIN INST FUER IMMUNPRAEPARAT [DE] +**Classification:** - international: **C07K16/00; C12P21/08;** (IPC1-7): C12P21/08

- european: C07K16/00

Application number: DE20011020835 20010427**Priority number(s):** DE20011020835 20010427**Also published as:**

- DE 10120835 (C2)

Cited documents: DE69213695T (T2) DE6925971T (T2) DE68913962T (T2) US4963517 (A) [View all](#)**Abstract of DE 10120835 (A1)**

Batch method (M1) for preparing antibodies (Ab) by suspension culture of Ab-expressing cells, in a nutrient medium, in a reactor fitted with a material-exchange device having an exclusion limit below the molecular weight of Ab, with supply of exchange medium and removal of metabolic waste products, is new. Batch method for preparing antibodies (Ab) by suspension culture of Ab-expressing cells, in a nutrient medium, in a reactor fitted with a material-exchange device having an exclusion limit below the molecular weight of Ab, with supply of exchange medium and removal of metabolic waste products. In a start-up phase, the reactor is inoculated and exponential growth of the cells is initiated by stepwise addition of nutrient medium, to maintain cell density 0.1-5 million/ml; in a build-up phase, a defined volume of exchange medium is supplied to a circuit, so that the cell density does not fall below 0.1 million/ml (of suspension and medium in the circuit), and this phase is continued until cell density is at least 5×10^6 /ml. Once this cell density is reached, the stationary phase is imposed by applying, and reversing in a rhythmic manner, a pressure gradient between the circuit and the reactor to cause material transport along this gradient. This results in transfer of nutrients into the reactor and of metabolic waste products into the circuit, from the reactor, with the volume exchange being 0.05-1 of suspension volume/day.